



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 32 337 T2** 2007.07.12

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 153 114 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 32 337.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NO00/00056**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 906 778.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/049117**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.02.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.11.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.07.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C11C 3/02** (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
990739 **17.02.1999** **NO**

(73) Patentinhaber:
Pronova Biocare AS, Lysaker, NO

(74) Vertreter:
Meissner & Meissner, 14199 Berlin

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**HARALDSSON, G., Gudmundur, IS-109 Reykjavik,
IS; THORSTAD, Olav, N-3940 Heistad, NO;
KRISTINSSON, Björn, IS-105 Reykjavik, IS**

(54) Bezeichnung: **LIPASEKATALYSIERTE VERESTERUNG VON FISCHOELEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft lipasekatalysierte Veresterung von Fischölen.

[0002] Es ist auf dem Fachgebiet bekannt, Ölprodukte verschiedener Arten, einschließlich Fischölen, mit Hilfe von Lipasekatalysatoren zu raffinieren deren Spezifität unter den verwendeten Raffinierungsbedingungen die Wiedergewinnung eines gewünschten Produktes erhöht.

[0003] Zum Beispiel offenbarten wir in PCT/WO95/00050 ein Verfahren zur Behandlung einer Ölzusammensetzung, die gesättigte und ungesättigte Fettsäuren in Form von Triglyzeriden enthält, bei den Umesterungsreaktionsbedingungen mit einem C₁₋₆-Alkohol, wie Ethanol, unter im Wesentlichen wasserfreien Bedingungen in Gegenwart einer Lipase, die aktiv ist, um vorzugsweise die Umesterung der gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren zu katalysieren. Mit den bevorzugten Lipasen, Pseudomonas sp.-Lipase (PSL) und Pseudomonas fluorescens-Lipase (PFL) war es möglich, aus Fischölquellen Konzentrate herzustellen, die mehr als 70 Gewichtsprozent (Gew.-%) der geschäftlich und therapeutisch wichtigen mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren EPA (Eicosapentaensäure, C20:5) und DHA (Docosahexansäure, C22:6) in Form von Glyzeriden enthalten.

[0004] Es gibt viele Beispiele in der Literatur und Patentliteratur, die die Verwendung von Lipasen beschreiben, um EPA und/oder DHA in Fischöl durch Hydrolyse zu konzentrieren, einschließlich WO-A-98/18952.

[0005] Mehrere lipasekatalysierte Raffinationsverfahren haben Glycerin verwendet.

[0006] Beispielsweise lehrt JP 62-91188 (1987) ein Verfahren zur Herstellung von Glyzeriden von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), wobei die PUFA als freie Säure oder Ester mit Glycerin in Gegenwart einer hitzebeständigen Lipase umgesetzt wird. Die Fettsäurezusammensetzung des so erhaltenen Glyzeridproduktes ist im Wesentlichen dieselbe wie beim Ausgangs-PUFA.

[0007] WO91/16443 offenbart ein Verfahren zur Umwandlung von PUFA in Triglyzeride. Die freien Fettsäuren, zum Beispiel Gemische aus EPA und DHA, werden mit etwa stöchiometrischen Mengen Glycerin in Gegenwart einer Lipase, besonders Candida antarctica, unter im Wesentlichen wasserfreien, organisches Lösungsmittel-freien, erhöhten Temperaturbedingungen mit ununterbrochenem Entfernen von Wasser und flüchtigen Alkoholen umgesetzt. Wir sind uns im Klaren, dass es in diesem Verfahren wenig oder keine Unterscheidung zwischen EPA und DHA gab.

[0008] In einem Aufsatz in Int. J. Food Sci. Technol. (1992), 27, 73–76, beschreiben Lie und Molin die Veresterung eines Fischölfettsäurekonzentrates mit Glycerin unter Verwendung von drei verschiedenen Lipasen, einschließlich MML. Unter den verwendeten Bedingungen (5% Wasser) erhielten sie eine freie saure DHA-angereicherte Fraktion freier Fettsäuren (etwa 50% des Ausgangsmaterials) und eine Glyzeridfraktion mit demselben EPA-Gehalt wie das ursprüngliche Fischölkonzentrat. Folglich wurde etwas Selektivität beobachtet.

[0009] Ein Aufsatz von Myrnes et al. in JAOCS, Bd. 72, Nr. 11 (1995), 1339–1344 offenbart eine organische Lösungsmittel-freie, lipasekatalysierte Glyzerolyse von Fischölen. Eine Vielzahl von verschiedenen Lipasen wird geprüft, und die Umsetzungen werden bei niedrigen Temperaturen (12°C oder weniger) in Gegenwart von verhältnismäßig hohen (3,6%) Mengen Wasser laufengelassen. Analyse der so erhaltenen Monoglyzeridfraktion zeigte in einigen Fällen gute Selektivität zwischen ungesättigten und gesättigten Fettsäuren, aber keine wesentlichen Unterschiede zwischen einzelnen PUFA.

[0010] Moore et al. in JAOCS, Bd. 73, Nr. 11 (1996), 1409–1414 lehren die Hydrolyse eines Fischöls in Gegenwart von Candida rugosa-Lipase (CRL), um getrennte DHA-angereicherte und EPA-angereicherte Fraktionen zu erzeugen.

[0011] Anschließend wird die EPA-angereicherte Fraktion freier Fettsäuren mit Glycerin in Gegenwart von Rhizomucor miehei-Lipase (MML) wiederverestert.

[0012] Ein Aufsatz von McNeill et al. in JAOCS, Bd. 73, Nr. 11 (1996), 1403–1407 offenbart eine MML-katalysierte Veresterung eines n-3-PUFA-Konzentrates mit stöchiometrischen Mengen Glycerin bei 55°C mit ununterbrochenem Entfernen von Wasser. Die so erhaltene Triglyzeridfraktion enthielt dieselbe Menge DHA wie die Beschickung.

[0013] Schließlich werden WO96/37586 und WO96/37587 erwähnt. Beispiel 3 von WO96/37586 offenbart ein Verfahren, bei welchem ein Konzentrat freier Fettsäuren, das aus Chilenischem Fischöl stammt, das (nach Lösungsmittelfraktionierungen von Natriumsalzen) 25% EPA und 18% DHA umfasst, unter Verwendung einer immobilisierten *Candida rugosa*-Lipase (CRL) in Gegenwart von 10% Wasser bei 35°C direkt mit Glycerin verestert wurde. Nach 120 Stunden hatte der Umfang der Umwandlung etwa 60% erreicht. In dem erhaltenen Glyceridgemisch enthielten die Triglyzeride 28,2% EPA und 3,8% DHA und die Monoglyzeridfraktion wies 28,9% EPA und 4,5% DHA auf. Die restlichen freien Fettsäuren umfassten 23,2% EPA und 31,5% DHA. Dieses zeigt gute Selektivität zwischen EPA und DHA an.

[0014] Im Gegensatz dazu zeigt in den Beispielen 1 und 2 die MML-katalysierte Wiederveresterung einer Fraktion freier Fettsäuren mit Glycerin keine wesentliche Selektivität zwischen EPA und DHA.

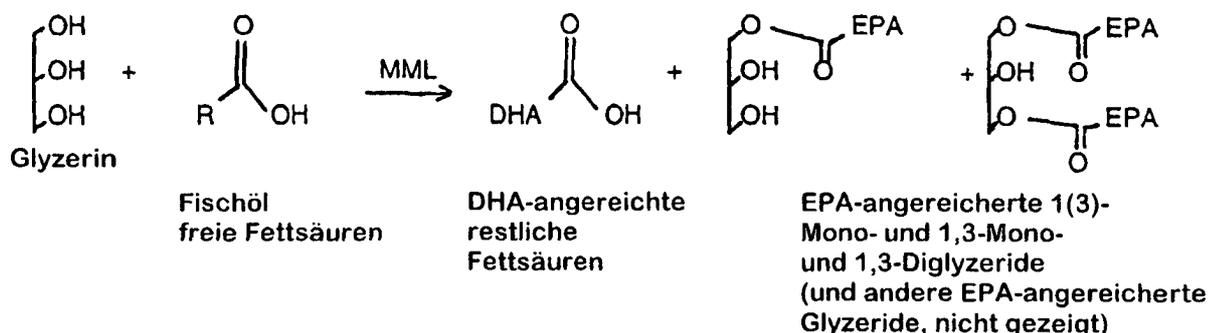
[0015] Die Offenbarung von WO96/37587 ist der von WO96/37586 ähnlich. Die Beispiele 1, 4, 6 und 8 zeigen die Glyzerolyse von PUFA mit MML ohne irgendeine Unterscheidung zwischen EPA und DHA.

[0016] Es ist ersichtlich aus dieser, auf keinen Fall vollständigen Diskussion des Stands der Technik, dass umfangreiche Forschung durchgeführt worden ist, um lipasekatalysierte Verfahren zum Isolieren derartiger geschäftlich wichtiger PUFA als EPA und DHA aus Zusammensetzungen, wie Fischölen, die sie in verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen enthalten, zu entwickeln.

[0017] Wir haben jetzt ein lipasekatalysiertes Verfahren zur Herstellung von Konzentraten von EPA und von DHA durch die direkte Veresterung von freier Fettsäure aus Fischöl entdeckt, welches durch Auswahl der Lipase ermöglicht, den EPA-/DHA-Gehalt des so erhaltenen Konzentrates einzustellen, um den verschiedenen Kundenbedürfnissen zu entsprechen.

[0018] Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Veresterung einer Fischölzusammensetzung bereit, die EPA und DHA als freie Fettsäuren enthält, um eine Fraktion freier Fettsäure zu erzeugen, die in mindestens einer dieser Fettsäuren im Vergleich zur Ausgangszusammensetzung angereichert ist, die den Schritt des Umsetzens der Fischölzusammensetzung mit Glycerin in Gegenwart eines Lipasekatalysators unter vermindertem Druck und im Wesentlichen organisches Lösungsmittel-freien Bedingungen, und des Wiedergewinns einer Fraktion freier Fettsäuren, die in mindestens einem von EPA und DHA angereichert ist, umfasst.

[0019] Die vorliegende Erfindung beruht auf der Entdeckung, dass Glycerin als hervorragendes Substrat für eine lipasekatalysierte direkte Veresterung von freien Fettsäuren aus Fischöl dienen kann, vorausgesetzt, dass bestimmten kritischen Reaktionsbedingungen gefolgt wird. Diese Feststellung war angesichts der vorherigen Forschung unter Verwendung von Glycerin, das sich auf das Vorstehende bezog, überhaupt nicht erwartet worden. Die Hauptveresterungsreaktion kann durch die folgende Gleichung schematisch dargestellt werden, wobei der Lipasekatalysator *Rhizomucor miehei* (MML) ist:



[0020] Das Produkt enthält auch andere Arten von EPA-angereicherten Glyzeriden, die in der schematischen Gleichung nicht gezeigt sind.

[0021] Wie nachstehend ausführlicher diskutiert und in Beispiel 8 veranschaulicht wird, kann die Auswahl des Lipasekatalysators das Wesen des Produktes entscheidend beeinflussen. Im Fall von MML, die im veranschaulichten Reaktionsschema verwendet wird, ist das Produkt eine DHA-angereicherte Fraktion freier Fettsäuren und eine EPA-angereicherte Glyzeridfraktion.

[0022] Ein wesentliches Merkmal des vorliegenden Verfahrens ist, dass es die Tatsache ausnutzt, dass die

Selektivität einer Lipase in Richtung einzelner Fettsäuren größer ist, wenn sie in Form von freien Säuren anstatt als Glyceride vorliegen, weil Komplikationen bezüglich Lipaseregioselektivität oder Positionselektivität vermieden werden. Überraschenderweise ist die Umsetzung mit Glycerin weit weniger erfolgreich, wenn die EPA und DHA als Ester anstatt als freie Säuren vorliegen, wie in Beispiel 10 (Vergleich) nachstehend gezeigt.

[0023] Die Verwendung von Glycerin gemäß der vorliegenden Erfindung als Substrat hat den weiteren Vorteil, dass es die Trennung des Glycerids und der Produktfraktionen freier Fettsäuren durch Molekulardestillation unterstützt. Es wird angenommen, dass der Grund dafür ist, dass die Ester eines dreiwertigen Alkohols, wie Glycerin, weniger flüchtig sind als ähnliche Ester von kurzkettigen Alkoholen, wie Methanol, Ethanol und Propanol.

[0024] Es ist festgestellt worden, dass die relativen Mengen von Glycerin wichtig sind, um die Veresterungsreaktion erfolgreich zu machen. Vorzugsweise sollte ein molares Verhältnis von Glycerin zu den freien Fettsäuren in der Ausgangszusammensetzung von 1:1,5 bis 1:3, stärker bevorzugt von 1:1,5 bis 1:2,5 verwendet werden. In unserer experimentellen Arbeit haben wir bis jetzt festgestellt, dass ein molares Verhältnis von etwa 1:2 von Glycerin zu den Fettsäuren optimal ist (entsprechend einem Verhältnis von verfügbaren Hydroxylresten zu freien Fettsäuren von 1,5:1).

[0025] Es ist wesentlich, dass die Veresterungsreaktion bei vermindertem Druck durchgeführt werden sollte, um Wasser aus dem Reaktionssystem zu entfernen, wenn es erzeugt wird. Dieses ist erforderlich, um die Umsetzung irreversibel zu machen, wodurch es möglich gemacht wird, hohe Wiedergewinnungen der gewünschten EPA-/DHA-Produkte zu erhalten. Folglich wird die Veresterung allgemein bei einem Druck von unter 6665 Pa und normalerweise von unter 1.333 Pa durchgeführt, z.B. von 133,3–1.333 Pa, obwohl wir die überraschende Beobachtung gemacht haben, dass die verringerten Druckbedingungen für optimale Lipaseaktivität zu einem gewissen Maß von der verwendeten bestimmten Lipase abhängig ist. Folglich kann es in einigen Fällen vorteilhaft sein, einen Druck von 1,333 bis 133,3 Pa zu verwenden, und in den Beispielen, welche folgen, berichten wir von hervorragenden Ergebnissen mit Drücken von höchstens 1,333–13,33 Pa. Die optimalen Niederdruckbedingungen für die bestimmte Lipase, die verwendet wird, können selbstverständlich durch routinemäßige Experimente leicht bestimmt werden.

[0026] Organische Lösungsmittel sollten im vorliegenden Verfahren, anders als bei vielen Systemen auf Lipasebasis nach dem Stand der Technik, fehlen, weil organische Lösungsmittel flüchtig sind und unter Vakuumbedingungen verdampfen.

[0027] Die Temperatur, bei welcher die Veresterungsreaktion durchgeführt wird, ist abhängig von der Fischölzusammensetzung, die behandelt wird, sowie von der Lipase, die verwendet wird. Es ist wünschenswert, dass die Viskosität der Fischölzusammensetzung niedrig genug sein sollte, um zu ermöglichen, dass die Zusammensetzung während der Umsetzung ausreichend gerührt wird, und aus diesem Grund ist es häufig erforderlich, Temperaturen von mindestens 20°C zu verwenden. Auf der anderen Seite sind zu hohe Temperaturen nicht wünschenswert, weil hohe Temperaturen gegen die kinetische Auflösung arbeiten, auf welcher die Fettsäurelipase-Unterscheidung basiert, und auch weil die EPA und DHA durch verlängerte Einwirkung von hohen Temperaturen zerstört werden können, während auch Lipasen gegenüber hohen Temperaturen intolerant sind. Beim Denken an Faktoren wie diese ist es allgemein bevorzugt, innerhalb des Bereichs von 20–40°C, häufig am meisten bevorzugt bei 37–40°C zu arbeiten, obwohl Temperaturen von 0–20°C für Fischölzusammensetzungen mit hohem EPA- und/oder DHA-Gehalt verwendet werden können, wobei die Zusammensetzung bei diesen niedrigen Temperaturen genügend flüssig bleibt, und umgekehrt können höhere Temperaturen im Bereich von 40–70°C für derartige stabile immobilisierte Lipasen wie MML und CAL möglich sein.

[0028] Das Ausgangsmaterial für das vorliegende Verfahren kann jede Zusammensetzung einer Fischquelle sein, die EPA und DHA in Form freier Säure enthält. Eine derartige Zusammensetzung kann durch Verseifung von Rohfischölen, z.B. mit Natriumhydroxid, gefolgt von der Ansäuerung mit z.B. Schwefelsäure gemäß Standardverfahren, die denen in den Fischöl-Verarbeitungsindustrien bekannt sind, erhalten werden. Typischerweise enthalten die Zusammensetzungen einen Gesamtgehalt von EPA und DHA in Form freier Säure von 15–35 Gew.-%, vorzugsweise 25–35 Gew.-%. Fischöle, welche reich an DHA sind, wie Thunfischöl, das etwa 5 Gew.-% EPA und 25 Gew.-% DHA enthält, sind zur Herstellung von DHA-Konzentraten durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung besonders geeignet, während Fischöle, die reich an EPA sind (zum Beispiel Sardinenöl mit etwa 18 Gew.-% EPA und 12 Gew.-% DHA) und Chilefischöl (20 Gew.-% EPA und 7 Gew.-% DHA), besonders geeignete Ausgangsmaterialien zum Herstellen von EPA-Konzentraten sind. Jedoch ist es ein Vorteil der vorliegenden Erfindung, dass preiswertere Fischöle mit niedrigerem Gesamt-EPA- und DHA-Gehalt, wie Heringsöl (etwa 6 Gew.-% EPA und etwa 8 Gew.-% DHA) als Ausgangsmaterialien für die Erzeugung von

EPA- und/oder DHA-angereicherten Fraktionen durch das Verfahren dieser Erfindung verwendet werden können, wie in den Beispielen gezeigt wird, welche später in dieser Beschreibung folgen.

[0029] Wie vorher in dieser Beschreibung erwähnt, ist es ein Merkmal des vorliegenden Verfahrens, dass es möglich ist, das Wesen der angereicherten Fraktionen durch die Wahl der verwendeten Lipase zu variieren. Zum Beispiel werden die folgenden Wirkungen mit den vermerkten Lipasen beobachtet:

- i. eine DHA-angereicherte Fraktion freier Fettsäuren und eine EPA-angereicherte Glyceridfraktion wird mit Rhizomucor miehei-Lipase (MML), Mucor javanicus-Lipase (MJL) und Aspergillus niger-Lipase (ANL) erhalten; und
- II. eine EPA/DHA-angereicherte Fraktion freier Fettsäuren und eine Glyceridfraktion, die an gesättigten Fettsäuren angereichert ist, wird mit Pseudomonas sp. – Amano AK (PSL), Pseudomonas fluorescens – Amano PS (PFL), des Rhizopus oryzae-Amano F (ROL) und Humicola Lanuginosa – Amano CE (HLL) erhalten.

[0030] Diese Fähigkeit, das Wesen des Produktes durch geeignete Auswahl des Lipasekatalysators zu variieren, hat den Vorteil, dass die Durchführung des Verfahrens eingestellt werden kann, um zu den besonderen Kundenbedürfnissen zu passen. Zum Beispiel kann ein Kunde ein DHA-Konzentrat für ergänzende Säuglingsnahrung benötigen, während ein anderer Kunde ein gemischtes EPA-/DHA-Konzentrat zur Herstellung eines Gesundheitsproduktes benötigen kann, aber den Erfordernissen beider Kunden kann einfach durch Ändern der verwendeten Lipasekatalysatoren entsprochen werden.

[0031] Selbstverständlich können dennoch mehr Möglichkeiten zum Einstellen der Zusammensetzung des Endproduktes durch Durchführen des Verfahrens in zwei oder mehreren Stufen bestehen, wobei verschiedene Lipasekatalysatoren in verschiedenen Stufen verwendet werden.

[0032] Die bevorzugten Lipasen für das vorliegende Verfahren sind Rhizomucor miehei (MML), welche stark zwischen EPA und DHA unterscheidet; und Pseudomonas-sp. PSL), welche zwischen EPA und DHA auf der einen Seite und den restlichen Fettsäuren in Fischenölen auf der anderen Seite unterscheidet.

[0033] Es ist bevorzugt, mindestens im industriellen Maßstab, eine immobilisierte Form der ausgewählten Lipase zu verwenden, weil festgestellt wurde, dass nicht nur Immobilisierung häufig die Aktivität des Enzyms, besonders mit sehr geringen Drücken, in der Größenordnung von 1,333 bis 133,3 Pa erhöht, sondern sie auch seine Stabilität verbessert und seine Wiedergewinnung unterstützt, welches alle Faktoren sind, welche die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens beeinflussen.

[0034] Ausreichend von der Lipase sollte verwendet werden, um die gewünschte Veresterungsreaktion zu bewirken. Bei unserer Arbeit mit immobilisiertem MML haben wir etwa 10 Gew.-% des immobilisierten Produktes, bezogen auf den Gehalt von Fettsäuren in der Fischzusammensetzung, die behandelt wird, verwendet, welches einer Konzentration von MML von etwa 1 Gew.-% (das im Handel erhältliche immobilisierte MML betrug etwa 10% Lipase und 90% Träger) entspricht.

[0035] Im Gegensatz dazu haben wir bei Verwendung von nicht-immobilisierten Lipasen Lipasekonzentrationen von 10 Gew.-% des Fettsäuregehalts verwendet.

[0036] Im Anschluss an die Beendigung der Veresterungsreaktion wird das Produkt durch Molekulardestillation in Fraktionen getrennt, die hauptsächlich freie Fettsäuren beziehungsweise Glyceride enthalten.

[0037] Der Molekulardestillationsschritt zum Trennen der Fraktion freier Fettsäuren aus der Glyceridfraktion kann bei einer Temperatur durchgeführt werden, die im Bereich von 100–200°C liegt, aber normalerweise im Bereich von 140–180°C liegt. Sein Erfolg hinsichtlich des erreichbaren Verhältnisses von Rückstand/Destillat hängt vom Vakuum ab. Das Vakuum kann in Abhängigkeit von Faktoren, wie den flüchtigen Komponenten, die im Gemisch vorliegen, variieren. Es liegt allgemein im Bereich von $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-2}$ mbar, aber ein Fachmann kann die Kombination des erreichbaren Vakuums, welches in einigen Fällen außerhalb des erwähnten Bereichs liegen kann, und einer geeigneten Temperatur verwenden, um das gewünschte Endergebnis zu erreichen.

[0038] Selbstverständlich kann das Produkt von einer ersten lipasekatalysierten Veresterung dann in einer oder mehreren nachfolgenden lipasekatalysierten Veresterungen unter Verwendung derselben oder einer anderen Lipase weiter konzentriert werden.

[0039] Die Fraktion freier Säuren, welche am Schluss des Verfahrens erhalten wird, kann entweder als solche verwendet werden, oder, wenn ein Produkt in Form der freien Säure für die beabsichtigte Verwendung nicht annehmbar ist, dann kann sie zuerst in Ethylester, Glycerid oder eine andere annehmbarere Form durch jedes geeignete Verfahren umgewandelt werden.

[0040] Ebenfalls kann diese Fraktion, wenn die getrennte Glyceridfraktion EPA oder DHA in wirtschaftlich lohnenden Konzentrationen enthält, auch weiterer Behandlung, zum Beispiel Hydrolyse mit wässrigem Alkali, um freie Säuren zu erzeugen, oder Veresterung mit Ethanol unterzogen werden, um Ethylester der Fettsäuren zu erzeugen. Die so erzeugte Fraktion freier Fettsäuren oder Ethylester kann dann, wenn gewünscht, z.B. durch Molekulardestillation weiter konzentriert werden.

[0041] Das Veresterungsverfahren der vorliegenden Erfindung weist mehrere Vorteile auf, welche es besonders zur Industrialisierung geeignet machen. Die Fähigkeit, die Zusammensetzung der Produkte, besonders durch Auswahl des Lipasekatalysators einzustellen, ist bereits erwähnt worden, aber weitere Vorteile, welche das Verfahren geschäftlich attraktiv machen, schließen ein:

- i. die hohen Ausbeuten der hochkonzentrierten EPA-, DHA- oder EPA- + DHA-Produkte, welche hergestellt werden können,
- ii. das Fehlen aller organischer Lösungsmittel, das folglich nicht nur die Reinigungsprobleme verhindert, welche die Gegenwart derartiger Lösungsmittel häufig verursachen kann, sondern auch die Größe des Verfahrens verringert, welches wirtschaftlich (geringerer Energiebedarf usw.) wichtig ist,
- iii. die Fähigkeit, immobilisierte Lipasekatalysatoren in mehreren, möglicherweise bis zu 20 oder mehr, aufeinanderfolgenden Läufen wiederzuverwenden, was folglich erneut dazu beiträgt, die Kosten niedrig zu halten,
- iv. die Fähigkeit, jede geeignete Fischölzusammensetzung zu verwenden, welche die mehrfachungesättigten Fettsäuren von Interesse enthält, und
- v. die gesamte Einfachheit der Veresterung und der nachfolgenden Trennungsvorgänge.

[0042] Die Erfindung wird durch die Beispiele, welche folgen, und bei welchen Flächenanteile in % durch GLC-Analyse erhalten werden, veranschaulicht.

Beispiel 1

[0043] In diesem Experiment wurde ein Hydrolyseprodukt von Heringsöl, das einen Flächenanteil von 5,6% EPA und einen Flächenanteil von 8,0% DHA (in beiden Fällen als freie Säure) enthält, mit Glycerin in Gegenwart der Rhizomucor miehei-Lipase (MML; Novo's Lipozyme) umgesetzt. Die Veresterungsbedingungen waren:

MML:	Dosierung von 10 Gew.-%, bezogen auf das Fettsäuresubstrat
Glycerin:	1 Äquivalent pro zwei Äquivalente freier Fettsäuren (stöchiometrischer Überschuss von Hydroxylresten von 1,5)
Temperatur:	40°C
Druck:	1,333 bis 13,33 Pa
organisches Lösungsmittel:	kein

[0044] Das experimentelle Verfahren war wie folgt. Zu freien Fettsäuren aus Heringsöl (10 g; Molekulargewicht ungefähr 290 g/mol; ungefähr 34,5 mmol) und Glycerin (1,56 g; Molekulargewicht 92,1 g/mol; 17,3 mmol) wurde immobilisierte Mucor miehei-Lipase (Novo's Lipozyme, 1,0 g) zugefügt. Das Gemisch wurde bei 40°C auf einer Magnetrührerheizplatte unter einem ununterbrochenen Vakuum von 1,333 bis 13,33 Pa leicht gerührt. Das flüchtige Wasser, das während des Fortschreitens der Umsetzung erzeugt wurde, wurde ununterbrochen in eine Flüssigstickstoffkühlfalle kondensiert.

[0045] Titration wurde verwendet, um das Fortschreiten der Umsetzung zu überwachen. Nach der ausgewählten Zeit wurde die Umsetzung durch Abtrennen des Enzyms durch Filtration eingestellt. Fraktionierung wurde durch präparative TLC an Kieselgel durchgeführt, und jede Lipidfraktion wurde anschließend nach Methylierung mit Standardverfahren der GLC Fettsäureanalyse unterzogen.

[0046] Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von HO freier Fettsäuren mit Glycerin durch MML.

Zeit	Umwandlung in % (Titration)	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 h	30,4	3,4	0,5	14,5	1,4	8,1	15,7	84,5	98,6
2 h	59,0	3,8	0,6	30,1	3,8	8,5	21,9	60,9	96,2
3 h	60,2	4,7	1,0	45,3	5,5	8,6	26,2	54,7	94,5
7 h	79,5	5,5	1,7	81,9	17,4	4,7	31,2	18,2	82,6
12 h	87,4	6,0	2,3	92,2	25,5	3,5	46,7	7,8	74,5
24 h	89,3	6,0	2,9	96,3	32,4	1,9	50,6	3,1	67,6
47 h	89,9	6,5	3,1	95,7	32,9	2,6	56,2	4,3	67,1

[0047] Nach 7 h bei 80% Umwandlung betrug das DHA-zu-EPA-Verhältnis 6,6:1, wobei DHA 31% und EPA weniger als 5% der restlichen freien Fettsäuren umfasst. Die DHA-Wiedergewinnung betrug 83%. Nach 12 h hatte dieses Verhältnis auf 13:1 und nach 24 h bei 89% Umwandlung auf 27:1 zugenommen, wobei die Wiedergewinnung von DHA noch nahe 70% lag. Jenseits dieser Menge war deutlich ein Gleichgewicht erhalten worden.

[0048] Dieses Experiment zeigt, dass unter Verwendung von MML als Lipase die vorliegende Erfindung ermöglicht, dass ein DHA-Konzentrat mit einer hohen Umwandlungsrate hergestellt wird.

Beispiel 2 (Vergleich)

[0049] Beispiel 1 wurde wiederholt, aber mit einer verringerten Konzentration von Glycerin (3 Äquivalente freier Fettsäuren pro Äquivalent Glycerin). Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 2 gezeigt:

Tabelle 2

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von HO freier Fettsäuren mit Glycerin durch MML bei 40°C

Zeit	Umwandlung in % (Titration)	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
0,5 h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,6	8,3	100	100
1 h	8,5	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	10,3	100	100
2 h	15,1	5,3	3,3	16,8	5,6	6,0	9,9	84,2	94,4
3 h	21,5	5,7	3,5	27,0	7,2	7,7	12,4	73,0	92,8
6 h	30,8	6,9	3,1	27,6	11,1	5,9	11,1	72,4	88,9
10 h	34,7	6,6	3,0	33,7	11,8	6,3	11,9	66,3	88,2
24 h	45,1	6,6	3,7	43,6	18,7	6,2	13,2	56,4	81,3
58 h	72,1	6,1	5,5	72,7	45,1	6,3	17,3	27,3	54,9
80 h	82,5	5,7	5,6	83,3	58,5	5,4	18,7	16,7	41,5

[0050] Wie bemerkt wird, sind die Ergebnisse dieses Experiments weit weniger zufriedenstellend als solche, die für das in Beispiel 1 verwendete 2:1-Verhältnis erhalten werden. Der Grund für diese Änderung ist nicht einfach zu erklären. Er kann die unzureichende Verfügbarkeit von Hydroxylresten oder eine übermäßige Menge an Fettsäuren betreffen, wenn berücksichtigt wird, dass die Mittelposition von Glycerin in seiner Teilnahme weit weniger verfügbar oder mindestens weit langsamer ist. Die Konsequenz ist, dass das Gleichgewicht viel zu früh erreicht wird und es keine wirksame Trennung zwischen EPA und DHA gibt.

Beispiel 3

[0051] Beispiel 1 wurde wiederholt, aber die Temperatur, bei welcher die Veresterungsreaktion durchgeführt wurde, wurde zwischen 30° und 60°C variiert. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 3 dargestellt:

Tabelle 3

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von HO freier Fettsäuren mit Glycerin durch MML durch Variieren der Temperatur

Temp. (°C)	Umwand- lung in % (Titration)	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
30	60,0	4,4	0,7	45,2	5,6	8,0	17,6	54,8	94,4
40	85,7	6,4	1,7	86,7	18,9	5,5	43,8	13,3	81,1
50	84,7	5,6	1,3	79,1	15,6	8,2	39,0	20,9	84,4
60	81,7	5,2	1,3	71,2	13,7	4,4	37,9	28,8	86,3

[0052] Die Ergebnisse legen dar, dass 40°C die Temperatur der Wahl für diese bestimmten Reaktionsbedingungen ist. Bei 30°C war Rühren schwierig, welches die schlechteren Ergebnisse bei dieser Temperatur erklärt. Jedoch ist das vorteilhafte Verhältnis zwischen DNA und EPA, 8,6:1 bei 60°C, verglichen mit 8,0:1 bei 40°C bemerkenswert, weil bei dieser Temperatur eine niedrigere Selektivität erwartet werden würde.

Beispiel 4

[0053] Beispiel 1 wurde erneut wiederholt, aber das Verhältnis zwischen Glycerin und den freien Fettsäuren sowohl bei 40°C als auch 60°C wurde variiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 4 dargestellt:

Tabelle 4

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von HO freier Fettsäuren mit Glycerin durch MML durch Variieren des Glyzeringehalts.

G1/ FFA- Ver- hältnis	Umwand- lung in % (Titration)	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
40°C									
1/1	84,4	5,7	2,0	63,7	22,5	11,2	37,2	32,3	77,5
1/2	84,3	6,2	2,0	71,4	21,1	9,3	40,2	28,6	78,9
1/3	67,8	6,3	2,5	77,9	19,7	7,3	21,4	22,1	80,3
60°C									
1/2	91,9	5,4	3,3	97,3	42,2	1,5	38,9	2,7	57,8
1/3	83,7	5,9	2,9	86,8	28,5	7,0	37,3	13,2	71,5
1/4	69,5	5,2	3,0	59,6	22,5	6,8	19,3	40,4	77,5

[0054] Diese Ergebnisse bestätigen die vorhergehende Feststellung, dass ein vorteilhaftes DHA/EPA-Verhältnis, sowie eine hohe Wiedergewinnung von DHA, bei 40°C mit einem molaren Verhältnis von 1:2 zwischen Glycerin und freien Fettsäuren erhalten werden kann.

Beispiel 5

[0055] Dieses Experiment zeigt die direkte Veresterung einer Zusammensetzung freier Fettsäuren, die durch Hydrolyse von Chilefischöl unter Verwendung von MML als Katalysator erhalten wird.

[0056] Das Chileöl umfasste einen Flächenanteil von 16,8% EPA und einen Flächenanteil von 12,3% DHA.

[0057] Die Veresterungsreaktionsbedingungen waren dieselben wie in Beispiel 1. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 5 gezeigt:

Tabelle 5

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von freien Fettsäuren aus Chileöl und Glycerin mit MML.

Zeit	Umwand- lung in %	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 h	18,6	12,1	1,0	12,0	1,5	20,4	14,3	88,0	98,5
2 h	39,4	14,3	1,2	31,4	4,0	20,4	18,7	68,7	96,0
3 h	48,3	13,4	1,2	38,2	4,9	21,7	22,4	61,8	95,1
5 h	53,6	16,3	1,4	45,4	5,5	22,1	28,1	54,6	94,4
7 h	68,0	16,7	1,9	60,9	11,0	22,7	32,0	39,1	89,0
28 h	80,0	20,1	3,5	85,9	21,6	13,2	50,0	14,1	78,4

[0058] Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen, dass das Chileöl ein geeignetes Ausgangsmaterial für die wirksame Trennung sowohl von EPA als auch von DHA mit MML ist. Zum Beispiel waren nach 28 h Reaktionszeit 86% des Ausgangs-EPA in die Glyzeridfraktion getrennt worden, wohingegen 78% von DHA in der Fraktion restlicher Fettsäuren bleibt, die 50% DHA und 13% EPA umfasst.

Beispiel 6

[0059] Beispiel 1 wurde unter Verwendung von Rohthunfischöl als Ausgangsmaterial, das 5,0% EPA und 18,2% DHA umfasst, erneut wiederholt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 6 angegeben:

Tabelle 6

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von freien Fettsäuren aus Thunfischöl und Glycerin mit MML.

Zeit	Umwand- lung in %	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
2 h	55,2	4,8	2,0	42,3	5,6	8,1	42,2	57,7	94,4
4 h	70,6	6,0	6,5	68,9	21,7	6,5	56,0	31,1	78,3
6 h	77,1	5,3	3,6	73,2	14,0	5,6	64,3	26,8	86,0
8 h	78,1	5,5	9,0	91,5	45,4	2,0	63,9	8,5	64,6
28 h	89,0	4,6	16,4	91,1	76,9	3,7	39,7	8,9	23,1

[0060] Wenn man bedenkt, dass das verwendete Thunfischöl roh war und verhältnismäßig geringe Mengen DHA enthielt, waren die erhaltenen Ergebnisse hervorragend.

Beispiel 7

[0061] Beispiel 1 wurde in einem größeren (100 g) Maßstab wiederholt. Dieselben Bedingungen wie vorher mit einem molaren Verhältnis von 1:2 zwischen Glycerin und freien Fettsäuren unter Vakuum bei 40°C wurden verwendet. 10% Dosierung von MML wurde verwendet und jede Umsetzung nach 16 Stunden eingestellt. Nach jedem Lauf wurde die Lipase an einem gesinterten Glastrichter unter einem Strom von Stickstoffatmos-

phäre abfiltriert. Wenn erforderlich, wurde die Lipase zwischen den Läufen unter Stickstoff bei Raumtemperatur gelagert. Die Ergebnisse von zwanzig aufeinanderfolgenden Läufen sind in Tabelle 7 angezeigt.

Tabelle 7

Die Ergebnisse der Produktivitätsuntersuchungen der direkten Veresterungsreaktion von freien Fettsäuren aus Heringsöl und Glycerin mit MML.

Lauf- Nr.	Umwand- lung in %	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1	80,0	6,7	2,2	79,8	25,8	6,8	25,3	20,2	74,2
2	90,0	6,8	4,1	93,5	53,4	4,2	32,5	6,5	46,6
3	92,3	7,3	5,1	96,0	62,4	3,6	36,6	4,0	37,6
4	92,5	6,9	3,2	93,4	53,2	6,0	34,4	6,6	46,8
5 ^a	89,9	6,0	4,4	92,6	67,1	4,3	19,3	7,4	32,9
6	91,1	6,7	5,5	91,4	60,8	6,5	36,1	8,6	39,2
7 ^a	83,0	6,8	6,2	82,3	58,3	7,1	21,7	17,7	41,7
8	89,3	5,6	3,5	86,2	50,1	7,4	28,9	13,8	49,9
9	88,1	5,5	3,3	89,4	42,9	4,8	32,6	10,6	57,1
10 ^b	55,0	-	-	-	-	-	-	-	-
11	90,1	9,6	3,2	92,6	38,6	7,0	46,4	7,4	61,4
12	93,2	7,3	5,4	95,1	64,0	5,2	41,3	4,9	36,0
13	93,7	6,0	4,8	93,9	57,8	3,8	34,3	6,1	42,2
14 ^a	86,4	5,3	4,6	85,3	56,1	5,8	22,7	14,7	43,9
15	93,0	6,2	5,7	95,0	68,5	4,4	34,6	5,0	31,5
16 ^a	87,9	7,5	5,0	91,9	59,0	4,9	25,3	8,1	41,0
17	91,1	5,6	4,5	92,3	55,0	4,7	37,6	7,7	45,0
18	93,5	6,4	4,0	95,4	93,5	4,4	33,4	4,6	36,5
19	91,2	6,1	4,2	91,9	54,4	5,6	36,5	8,1	45,6
20	90,0	7,2	3,5	91,5	47,4	6,1	35,4	8,5	52,6

a) diese Probe wurde nicht für die Trennung durch Molekulardestillation gesammelt

b) diese Probe wurde weder analysiert noch gesammelt für die Molekulardestillation

[0062] Wie aus Tabelle 7 bemerkt wird, behielt die Lipase ihre Aktivität während der zwanzig aufeinanderfolgenden Läufe ohne irgendeine wesentliche Verschlechterung.

Beispiel 8

[0063] Der Zweck dieses Experimentes war, darzulegen, dass andere Lipasen als MML im Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden können.

[0064] Siebzehn (17) verschiedene Lipasen oder Lipase-Erzeugungen wurden unter ähnlichen Reaktionsbedingungen zu solchen geprüft, die in Beispiel 1 verwendet wurden, aber bei höherem Druck im Bereich von 133,3 bis 2666 Pa unter Verwendung desselben Heringsöls wie in Beispiel 7 und mit einer festgelegten Reaktionszeit von 16 Stunden. Die Titration wurde verwendet, um den Umfang der Umwandlung zu überwachen. Das Glyzeridgemisch wurde von den restlichen freien Fettsäuren mit Hilfe präparativer TLC getrennt, wenn etwas Aktivität angezeigt wurde und die Fettsäurezusammensetzung der beiden so erhaltenen Fraktionen durch GLC bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8

Ergebnisse der Verwendung verschiedener Lipasen bei der direkten Veresterungsreaktion von freien Fettsäuren aus Heringsöl und Glycerin.

Li- pase	Umwand- lung in %	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
PSL	17,4	0	0	0	0	4,4	5,6	100	100
PFL	23,5	0	0	0	0	6,1	7,9	100	100
CAL ^a	75,9	6,5	7,7	75,3	72,1	6,7	9,3	24,7	27,9
CAL ^a	69,2	5,8	8,5	66,1	70,9	6,7	7,8	33,9	29,1
MJL	71,8	4,0	0	62,2	0	6,2	10,3	37,8	100
LNL ^c	40,2	0	0	0	0	6,4	9,2	100	100
PRL	17,9	4,8	8,2	15,1	17,1	5,8	8,6	84,9	82,9
ANL	20,4	4,7	0	20,1	0	4,8	6,1	79,9	100
ROL	31,6	0	0	0	0	5,7	7,0	100	100
PCL	0	-	-	-	-	-	-	-	-
HLL	32,4	0	0	0	0	1,1	1,5	100	100
RDL	0	-	-	-	-	-	-	-	-
CLL	0	-	-	-	-	-	-	-	-
MML ^d	76,0	-	-	-	-	-	-	-	-
PPL	24,4	4,3	6,3	19,3	22,0	5,7	7,2	80,7	78,0
RNL	11,9	3,9	1,6	18,2	3,6	2,4	5,6	81,8	96,4

a) Lipase SP 382 von Novo Nordisk.

b) Lipase SP 435 von Novo Nordisk.

c) Lipase N con. 05501.

d) MML wurde zum Vergleich des Umfangs einer Umwandlung eingeschlossen. Nicht weiter analysiert

[0065] Es ist interessant, aus der Tabelle zu bemerken, dass die *Mucor javanicus*-Lipase (MJL) von Amano unter diesen Bedingungen zwischen EPA und DHA stark zu unterscheiden scheint und eine hohe Aktivität anzeigte. Ein ähnliches Verhalten des Unterscheidens zwischen EPA und DHA zugunsten des EPA wurde auch durch die *Aspergillus niger*-Lipase (ANL) und auch die *Rhizopus niveus*-Lipase (RNL) angezeigt, aber die Aktivität war viel niedriger. PSL und PFL zeigten unter diesen Bedingungen Aktivität an, ohne erheblich zwischen EPA und DHA zu unterscheiden. Diese Lipasen sind deshalb unter diesen Bedingungen zum Konzentrieren sowohl von EPA als auch von DHA zusammen aus Fischenöl geeignet. Es ist gezeigt, dass auch LNL, ROL und HLL zum Konzentrieren sowohl von EPA als auch von DHA in Fischöl nützlich sind, weil sie eine hohe Aktivität anzeigen.

[0066] Im Gegensatz dazu unterschied die *Candida antarctica*-Lipase, obwohl sie eine hohe Aktivität anzeigt, die mit der von MML vergleichbar ist, zwischen EPA und DHA in ihrer Aktivität nicht, noch zeigte sie eine starke Unterscheidung zwischen ihnen und anderen Fettsäuren, die in dem Fischöl vorliegen, an. CAL ist deshalb unter diesen Bedingungen zur Verwendung nicht geeignet.

Beispiel 9 (Vergleich)

[0067] Beispiel 8 wurde für mehrere der Lipasen aber unter Verwendung eines beträchtlich höheren Vakuums von 1,333–13,33 Pa wiederholt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 9 dargestellt:

Tabelle 9

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von freien Fettsäuren aus Sardinenöl und Glycerin unter hohem Vakuum mit verschiedenen Lipasen unter Verwendung von 2 Äquivalenten FFA und 1 Äquivalent Glycerin nach 24 Stunden bei 40°C.

Li- pase	Umwand- lung in %	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
PRL	4,9	7,3	4,5	2,1	2,0	17,1	11,0	97,9	98,0
PFL	2,5	5,5	4,8	0,8	1,1	17,1	11,5	99,2	98,9
LNL	4,3	4,6	1,5	1,1	0,6	18,1	10,9	98,9	99,4
ROL	6,4	8,0	1,0	2,9	0,6	18,2	11,8	97,1	98,4
CAL	94,0	12,6	7,7	93,4	90,1	14,0	13,3	6,6	9,9
ANL	1,7	13,4	9,5	1,3	1,6	18,0	10,2	98,7	98,4

[0068] Die Ergebnisse, die in Tabelle 9 gezeigt sind, stehen in ziemlich krassem Gegensatz zu solchen, die in Tabelle 8 für dieselben Lipasen gezeigt sind.

[0069] Folglich war der Umfang der Umwandlung für alle Lipasen, außer CAL, viel niedriger, und für keine der Lipasen gab es eine wesentliche Unterscheidung zwischen EPA und DHA. Es wird angenommen, dass die geringere Aktivität aller Lipasen, außer CAL, vermutlich dem sehr hohen Vakuum zuzuschreiben ist, das zum Entfernen des wesentlichen Wassergehalts der Lipase mit beträchtlicher schädlicher Wirkung auf die Aktivität der Lipase verwendet wird.

Beispiel 10 (Vergleich)

[0070] In diesem Experiment wurden Sardinenölethylester unter Verwendung mehrerer verschiedener Lipasen direkt mit Glycerin verestert. Die Umsetzungen wurden unter Rühren bei 40°C 24 Stunden lang unter Vakuum unter Verwendung der Lipase bei einer Konzentration von 10% und von zwei Äquivalenten Ethylester pro Äquivalent Glycerin durchgeführt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 10 dargestellt. Der Umfang der Umwandlung wurde auf die Menge von restlichen Ethylestern, die im Reaktionsgemisch vorliegen, bezogen.

Tabelle 10

Die Ergebnisse des Enzymscreenings für die Umsetzung von Ethylester aus Sardinenöl mit Glycerin nach 24 Stunden bei 40°C.

Lipase	Umwand- lung in %	Ethylester			Glyzeride			freie Fettsäuren		
		Gew.-%	EPA	DHA	Gew.-%	EPA	DHA	Gew.-%	EPA	DHA
<i>unter</i>										
<i>Vakuum</i>										
MML	61,6	38,4	17,8	18,1	55,7	17,4	6,7	5,7	0,9	1,8
CRL	2,6	97,4	15,1	9,4	1,2	5,9	3,6	1,4	6,5	3,8
RDL	3,5	96,5	18,0	11,5	2,8	10,1	3,7	0,8	4,7	0,0
ROL	3,5	96,4	17,4	10,5	2,5	6,6	2,6	1,1	6,0	6,2
PCL	3,2	96,8	18,2	11,4	1,0	3,1	1,6	0,4	-	-
PSL	7,1	92,9	15,7	10,5	5,8	4,6	5,4	0,6	-	-
PFL	3,8	96,2	16,7	11,0	3,9	9,0	5,0	0,0	-	-
MJL	5,2	94,8	18,5	11,6	5,0	4,8	2,3	0,0	-	-
PPL	3,2	96,8	18,2	11,4	1,0	3,1	1,6	1,2	10,6	7,1

[0071] Es ist aus Tabelle 10 ersichtlich, dass die Glyzerolysereaktion hinsichtlich der Umwandlung viel langsamer ablief als die direkte Veresterung der freien Fettsäuren mit Glycerin. Nur MML zeigte nur beträchtliche Umwandlung an und die anderen Lipasen zeigten sehr wenig oder keine Aktivität an.

[0072] Dieses Experiment zeigt, dass Ethylester, obwohl vorteilhafter und leichter erhältlich als Ausgangsmaterial, kein bevorzugtes Ausgangsmaterial in dieser Erfindung darstellen.

Beispiel 11

[0073] Beispiel 1 wurde unter Verwendung eines semi-raffinierten Thunfischöls, das 5,2% EPA und 24,5% DHA enthält, als Ausgangsmaterial wiederholt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 11 angegeben.

Tabelle 11

Das Fortschreiten der direkten Veresterungsreaktion von freien Fettsäuren aus semiraffiniertem Thunfischöl und Glycerin mit MML.

Zeit	Umwandlung in %	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 h	16,8	3,4	1,6	12,0	1,3	5,1	24,5	88,1	98,7
2 h	29,1	3,9	3,3	19,7	3,9	6,5	33,5	80,3	96,1
3 h	40,5	3,9	2,0	29,3	4,0	6,4	32,4	70,7	96,0
4 h	45,5	3,7	1,6	31,6	3,4	6,6	36,9	68,4	96,6
5 h	51,1	3,7	1,9	35,8	4,5	7,0	41,3	64,2	95,5
6 h	56,2	3,9	1,8	41,1	5,0	7,2	44,4	58,9	95,0
7 h	57,6	3,6	1,7	39,5	4,8	7,4	45,7	60,5	95,2
11 h	64,2	4,1	1,9	52,2	6,7	6,8	48,1	47,8	93,4
24 h	74,2	5,2	2,8	71,4	10,3	6,0	71,1	28,6	89,8
48 h	90,0	6,7	5,0	90,9	21,4	2,9	77,5	9,1	78,7

[0074] Es ist ersichtlich, dass gute Umwandlung, mit wirksamer Unterscheidung zwischen EPA und DHA erhalten wurde.

Beispiel 12

[0075] Beispiel 1 wurde unter Verwendung eines Rohfischöls, das 20,0% EPA und 7,2% DHA enthält, als Ausgangsmaterial ein weiteres Mal wiederholt. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12

Das Fortschreiten der direkten Veresterung von freien Fettsäuren aus Rohfischöl und Glycerin mit MML.

Zeit	Umwandlung in %	Glyzeride				restliche freie Fettsäuren			
		Flächenanteil in %		Gew.-%		Flächenanteil in %		Gew.-%	
		EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA	EPA	DHA
1 h	29,4	15,2	0,6	22,0	3,1	22,4	7,8	78,0	96,9
2 h	56,4	19,7	1,1	50,2	10,3	25,2	12,8	49,8	89,7
3 h	73,0	23,0	1,9	75,3	24,5	20,4	15,8	24,7	75,5
4 h	78,4	23,5	2,4	83,0	32,5	17,4	18,4	17,0	67,5
5 h	79,2	25,6	3,1	84,4	37,0	18,0	20,3	15,6	63,0
6 h	82,1	25,6	3,1	87,5	37,5	16,7	23,9	12,5	62,5
7 h	82,3	23,2	3,6	86,8	40,4	16,4	25,1	13,2	59,6
12 h	82,3	22,7	5,4	86,9	48,5	15,8	26,7	13,1	51,5
24 h	97,2	20,7	6,9	98,1	94,3	14,2	14,5	1,9	5,7
33 h	97,2	19,5	6,4	97,7	94,9	15,7	11,8	2,3	5,1

[0076] Es wird aus den Ergebnissen in Tabelle 12 klar, dass Glyzeride eines hochvorteilhaften EPA-zu-DHA-Verhältnisses mit einer hohen Umwandlungsrate erhalten wurden. Das veranschaulichte Verfahren könnte deshalb die Grundlage für ein Verfahren zur Herstellung eines Konzentrates von EPA bilden.

Beispiel 13

[0077] Beispiel 1 wurde unter Verwendung freier Fettsäuren aus Thunfischöl (496 g), das 7,1% EPA und 29,4% DHA umfasst, Glycerin (79,9 g) und MML (25 g) erneut wiederholt. 68,3% Umwandlung wurde nach 4,5 h erhalten. Das Glyceridgemisch umfasste 9,0% EPA und 11,2% DHA, und die restlichen freien Fettsäuren umfassten 4,1% EPA und 54,9% DHA. Das Reaktionsgemisch wurde unter Verwendung einer Leybold KDI,-4 still (Leybold AG, Hanau, Germany) unter einem Vakuum von 0,3 Pa zu einer Kurzwegdestillation eingeführt. Entgasen wurde bei 60°C und eine Vordestillation bei 90°C durchgeführt [die Destillation bei 90°C ergab einen Verlust von nur 6,2% DHA. Der Rückstand der Vordestillation wurde bei 140°C destilliert. Die Ergebnisse sind nachstehend in Tabelle 13 dargelegt.

Tabelle 13

Ergebnisse der Kurzwegdestillation des Reaktionsgemisches von direkter Veresterung von freier Säure von Thunfischöl mit Glycerin unter Verwendung von MML.

Probe ¹⁾	Fraktionen aus Destillation			freie Fettsäuren		
	Gew.-% ²⁾	FFA in % ³⁾	DHA in % ⁴⁾	Gew.-% gesamt ⁵⁾	DHA in % ⁶⁾	EPA in %
D-140	42,0	85,0	43,5	73,3	52,6	6,1
R-140	58,0	19,6	26,0	23,3	74,1	2,3

- 1) Abkürzungen: D-140 ist das Destillat bei 140°C, R-140 ist der Rückstand von der Destillation bei 140°C.
- 2) Gewichtsprozent von Fraktionen von jeder Destillation einzeln.
- 3) Gewichtsprozent von freien Fettsäuren in jeder Fraktion.
- 4) DHA-Gehalt jeder Fraktion, wie auf den Flächenanteil in Prozent von der GC-Analyse bezogen.
- 5) Gewichtsprozent von freien Fettsäuren, wie auf Gesamtgewicht der restlichen freien Fettsäuren aus der enzymatischen Umsetzung bezogen.
- 6) DHA-Gehalt des Gegenstücks freier Fettsäuren jeder Fraktion, wenn auf den Flächenanteil in Prozent von der GC-Analyse bezogen.

[0078] Wie aus Tabelle 13 bemerkt werden kann, wurde der Hauptteil der Fettsäuren bei 140°C destilliert (73,3%, wenn auf den FFA-Gesamtgehalt bezogen), und sie umfassten 52,3% DHA. Diese Fraktion wurde mit 15% Monoglyceriden von 3,3% DHA-Gehalt verunreinigt. Der Rest enthält noch 23,3% FFA, die 74,1% DHA umfassen. Noch immer, wie aus Tabelle 13 hervorgeht, ist eine gute Anreicherung des DHA-Gehalts freier Fettsäuren durch dieses Verfahren erreichbar, wenn es den Molekulardestillationsschritt anwendet.

[0079] Ein noch besseres Ergebnis wird erwartet, wenn die Destillation bei einer höheren Temperatur von zum Beispiel 150–160°C oder bei einem besseren Vakuum durchgeführt wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Veresterung einer Fischölzusammensetzung, die EPA und DHA als freie Fettsäuren enthält, um eine Fraktion freier Fettsäuren zu erzeugen, die in mindestens einem dieser Fettsäuren im Vergleich zur Ausgangszusammensetzung angereichert ist, umfassend den Schritt des Umsetzens der Fischölzusammensetzung mit Glycerin in Gegenwart eines Lipasekatalysators unter vermindertem Druck und im Wesentlichen organisch Lösungsmittel-freien Bedingungen, und des Trennens einer Fraktion freier Fettsäuren, die in mindestens einem von EPA und DHA angereichert ist, durch Molekulardestillation

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das molare Verhältnis von Glycerin zu den freien Fettsäuren in der Ausgangszusammensetzung 1:1,5 bis 1:3 beträgt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das molare Verhältnis von Glycerin zu den freien Fettsäuren in der Ausgangszusammensetzung 1:1,5 bis 1:2,5 beträgt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das molare Verhältnis von Glycerin zu den freien Fettsäuren in der Ausgangszusammensetzung etwa 1:2 beträgt.

5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Veresterungsreaktion bei einem Druck von unter 6665 Pa durchgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Veresterungsreaktion bei einem Druck von unter 1333 Pa durch-

geführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Veresterungsreaktion bei einem Druck von 133,3 bis 1333 Pa durchgeführt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–6, wobei die Veresterungsreaktion bei einem Druck von 1,333 bis 133,3 Pa durchgeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Veresterungsreaktion bei einem Druck von 1,333 bis 13,33 Pa durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Veresterungsreaktion bei einer Temperatur von 20°–40°C durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der Lipasekatalysator an einem Träger immobilisiert ist.

12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei der Lipasekatalysator Rhizomucor meihei ist.

13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Lipase bevorzugt die Veresterung von EPA als von DHA katalysiert.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–12, wobei die Lipase bevorzugt die Veresterung von DHA als von EPA katalysiert.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–12, wobei die Lipase bevorzugt die Veresterung sowohl von EPA als auch von DHA als von anderen Fettsäuren katalysiert, die in der Fischölzusammensetzung vorliegen.

16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Molekulardestillation bei 100–200°C, stärker bevorzugt bei 140–160°C, bei einem Vakuum von 1×10^{-4} – 1×10^{-2} mbar durchgeführt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei einer oder mehrere zusätzliche Verfahrensschritte, wie Lipase-katalysierte Veresterungen oder Hydrolyse zur Erzeugung freier Fettsäuren oder Veresterung mit einem Alkohol zur Erzeugung von Estern nach dem Veresterungsschritt von Anspruch 1 durchgeführt werden können.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen